FACULTE DE MEDECINE DE PARIS

ANNÉE 1962

N° 1230

THÈSE

POUR LE

DOCTORAT EN MEDECINE

(DIPLOME D'ETAT)

PAR

PIÉCHAUD Danielle, née BOURBON

Née le 4 Septembre 1914, à Bourges (Cher)

Externe des Hôpitaux de Paris

Chef de Laboratoire à l'Institut Pasteur.

Présentée et soutenue publiquement le 1962

LES DIFFERENTES POSSIBILITES D'UTILISATION DE L'ACIDE CITRIQUE DANS LA FAMILLE DES ENTEROBACTERIES.

Président : Mr. MOLLARET, Professeur.

Ets. GERMAIN
9, Rue Dupuytren
PARIS-VIe
1962

FACULTE DE MEDECINE DE PARIS

ANNÉE 1962 N°

THÈSE

POUR LE

DOCTORAT EN MEDECINE

(DIPLOME D'ETAT)

PAR

PIÉCHAUD Danielle, née BOURBON

Née le 4 Septembre 1914, à Bourges (Cher)

Externe des Hôpitaux de Paris

Chef de Laboratoire à l'Institut Pasteur.

Présentée et soutenue publiquement le

R. UNIV. BIBLIOTHEEK LEIDEN

LES DIFFERENTES POSSIBILITES D'UTILISATION DE L'ACIDE CITRIQUE DANS LA FAMILLE DES ENTEROBACTERIES.

Président : Mr. MOLLARET, Professeur.

Ets. GERMAIN
9, Rue Dupuytren
PARIS-VIe
1962

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41549211_0036

PROFESSEURS HONORAIRES :

MM. ALAJOUANINE (T.), AUBIN (A.), BENARD (H.), BULLIARD (H.), CADENAT (F.), CHABROL (E.), CHAMPY (C.), DEBRE (R.), FEY (B.), GASTINEL (P.), HALPHEN (E.), HAZARD (R.), HEUYER (G.), LANTUEJOUL (P.), LAROCHE (G.), LEVY-SOLAL (E.), LIAN (C.), MATHIEU (P.), MOCQUOT (P.), MONDOR (H.), MONOD (R.), MOREAU (R.), MOULONGUET (P.), OLIVIER (E.), PASTEUR VALLERY-RADOT, PETIT-DUTAILLIS (D.), QUENU (J.), RICHET (C.), SENEQUE (J.), STROHL (A.), TANON (L.).

DOYEN : ..... Léon BINET,
Membre de l'Institut.

Ier ASSESSEUR : ..... Jean VERNE
2me ASSESSEUR : ..... Gaston CORDIER

I.- PROFESSEURS

1°)- CHAIRES DE SCIENCES FONDAMENTALES

a)- Professeurs titulaires :

	MM.
Anatomie	DELMAS (A.)
Anatomie pathologique	DELARUE (J.)
Anesthésiologie	BAUMANN (J.)
Biochimie médicale	(JAYLE (M.-F.) (SCHAPIRA (G.)
Biologie appliquée à l'Education phys. & aux Sports	CHAILLEY-BERT (P.)
Biologie médicale	FAUVERT (R.)
Cancérologie médicale et sociale	BERNARD (J.)
Embryologie	GIROUD (A.)
Histoire de la médecine et de la chirurgie (Lariboisière)	N...
Histologie	VERNE (J.)
Hygiène et médecine préventive	JOANNON (P.)
Médecine du Travail	DESOILLE (H.)
Médecine légale	PIEDELIEVRE (R.)
Microbiologie (Bactériologie et Virologie)	FASQUELLE (R.)
Parasitologie	GALLIARD (H.)
Pathologie chirurgicale	HUGUIER (J.)
Pathologie exotique	LAVIER (G.)

MM.

Pathologie expérimentale et comparée ..... MERKLEN (F.-P.)
Pathologie médicale ..... MILLIEZ (P.)
Pathologie respiratoire ..... TURIAF (J.)
Pathologie et thérapeutique générales ..... BOUDIN (G.)
Pharmacologie ..... CHEYMOL (J.)
Physiologie ..... (BINET (L.)
(BARGETON (D.)
Physiologie et pathologie obstétricale ..... LEPAGE (F.)
Physique médicale ..... (DOGNON (A.)
(DJOURNO (A.)
Radiologie médicale ..... DESGREZ (H.)
Technique chirurgicale et Chirurgie expérimentale ..... N...
Thérapeutique ..... CONTE (M.)

b)- Professeurs à titre personnel :

Biochimie médicale ..... (DESGREZ (P.)
(POLONOVSKI (J.)
Biologie médicale ..... BOURLIERE (F.)
Embryologie ..... TUCHMANN (H.)
Hygiène et médecine préventive ..... DEPARIS (M.)
Parasitologie ..... BRUMPT (L.-C.)
Pathologie chirurgicale ..... LAURENCE (G.)
Pharmacologie ..... LEVY (Melle J.)
Physiologie ..... PARROT (J.)
Physique médicale ..... KELLERSHOHN (L.)

2°)- CHAIRES DE SCIENCES CLINIQUES

a)- Professeurs titulaires :

MM.

Clinique carcinologique chirurgicale (Necker) ..... REDON (H.)
Clinique cardiologique (Broussais) ..... MOUQUIN (M.)
Cliniques chirurgicales (Beaujon ..... LORTAT-JACOB (J.-L.)
(Cochin ..... LEGER (L.)
(Hôtel-Dieu ..... PATEL (J.)
(Pitié ..... CORDIER (G.)
(Saint-Antoine ..... GOSSET (J.)
(Salpêtrière ..... SICARD (A.)
(Tenon ..... OLIVIER (Cl.)
Clinique de chirurgie infantile et orthopédique (Enfants-Malades) ..... FEVRE (M.)
Clinique chirurgicale orthopédique et réparatrice (Cochin) ..... MERLE d'AUBIGNE (R.)
Clinique de chirurgie cardio-vasculaire (Broussais) ..... GAUDART d'ALLAINES (F.de)
Clinique de chirurgie pleuro-pulmonaire (Laënnec) ..... MATHEY (J.)
Clinique endocrinologique (Pitié) ..... DECOURT (J.)
Clinique de génétique médicale (Enfants-Malades) ..... LAMY (M.)

MM.

Clinique gynécologique (Broca)	FUNCK-BRENTANO (P.)
Clinique des maladies cutanées et syphilitiques (Saint-Louis)	DEGOS (R.)
Clinique des maladies des Enfants (Enfants-Malades)	CATHALA (J.)
Clinique des maladies infectieuses (Claude-Bernard)	MOLLARET (P.)
Clinique des maladies mentales et de l'encéphale (Sainte-Anne)	DELAY (J.)
Clinique des maladies métaboliques (Necker)	HAMBURGER (J.)
Clinique des maladies du sang (Broussais)	MARCHAL (G.)
Clinique des maladies du système nerveux (Salpêtrière)	CASTAIGNE (P.)
Cliniques médicales (Boucicaut	LENEGRE (J.)
Cliniques médicales (Broussais	SOULIE (P.)
Cliniques médicales (Cochin	JUSTIN-BESANCON (L.)
Cliniques médicales (Cochin	BROUET (G.)
Cliniques médicales (Hôtel-Dieu	BARIETY (M.)
Cliniques médicales (Lariboisière	SEZE (S. de)
Cliniques médicales (Pitié	DREYFUS (G.)
Cliniques médicales (Saint-Antoine	KOURILSKY (R.)
Clinique médicale d'hydrologie thérapeutique et climatologie (Bichat)	DEBRAY (C.)
Clinique médicale propédeutique (Broussais)	GENNES (L. de)
Clinique médico-sociale du diabète sucré et des maladies de la nutrition (Hôtel-Dieu)	DEROT (M.)
Clinique de neuro-chirurgie (Pitié)	DAVID (M.)
Clinique neurologique (Salpêtrière)	GARCIN (R.)
Cliniques obstétricales (Baudelocque	LACOMME (M.)
Cliniques obstétricales (Foch (Suresnes)	MERGER (R.)
Clinique obstétricale et gynécologique (Port-Royal)	VARANGOT (J.)
Clinique ophtalmologique (Hôtel-Dieu)	RENARD (G.)
Clinique oto-rhino-laryngologique (Lariboisière)	AUBRY (M.)
Clinique de pédiatrie et de puériculture (Saint-Vincent-de-Paul)	LELONG (M.)
Clinique de pédiatrie sociale (Enfants-Malades)	MARIE (J.)
Clinique de pneumo-phtisiologie (Laënnec)	BERNARD (E.)
Clinique de neuro-psychiatrie infantile (Salpêtrière)	MICHAUX (L.)
Clinique de rhumatologie médicale et sociale (Cochin)	COSTE (F.)
Clinique stomatologique (Pitié)	DECHAUME (M.)
Clinique thérapeutique chirurgicale (Vaugirard)	ROUX (M.)
Clinique thérapeutique médicale (Saint-Antoine)	LEMAIRE (A.)
Clinique toxicologique	GAULTIER (M.)
Clinique traumatologique	PADOVANI (P.)
Séméiologie médicale	DOMART (A.)
Séméiologie et clinique chirurgicales	POILLEUX (F.)
Clinique urologique (Necker)	COUVELAIRE (R.)
Hygiène et clinique de la première enfance (Trousseau)	TURPIN (R.)

b)- Professeurs à titre personnel :

MM.

Médecine (	BOUR (H.)
Médecine (	LHERMITTE (F.)
Médecine (	PEQUIGNOT (H.)

II.- PROFESSEURS SANS CHAIRE, PROFESSEURS AGREGES ET MAITRES DE CONFERENCES-AGREGES

MM.

Anatomie	(CABROL (C.) (COUINAUD (C.) (GILLOT (C.) (OLIVIER (G.)
Anatomie pathologique	(GAUTHIER-VILLARS (Mlle P.) (Pr. s. ch. (ABELANET (R.) (BUSSER (F.) (CHOMETTE (G.) (GOUYGOU (Ch.), M. conf. (NEZELOFF (Ch.) (ORCEL (L.) (PAILLAS (J.)
Anesthésiologie	(KERN (E.) (VOURC'H (G.)
Bactériologie	(BARBIER (P.) (CHRISTOL (D.) (LE MINOR (L.) (TOURNIER (P.)
Biochimie médicale	(BAULIEU (Et.) (M. Conf. (BOURILLON (R.) (CARTIER (P.) (DREYFUS (J.-Cl.) (GONNARD (P.) (KRUH (J.) (JEROME (H.)
Biologie appliquée à l'Education physique et aux Sports	PLAS (F.)
Carcinologie	(BOIRON (M.) (DENOIX (P.) (MATHE (G.) (SELIGMANN (M.)
Dermato-syphiligraphie	(CIVATTE (J.) (DUPERRAT (B.)
Electro-radiologie	LEDOUX-LEBARD (G.)
Hématologie	(BESSIS (M.) (BILSKI-PASQUIER (G.) (DAUSSET (J.) (DUHAMEL (G.)
Histologie	(COUJARD (R.), Pr. s. ch. (MAROIS (M.) (RACADOT (J.)
Hydrologie	(BESANÇON (F.) (CORNET (A.)
Hygiène	(BOYER (J.), Pr. s. ch. (BLANCHER (G.) (CORRE-HURST (Mme L.) (SAPIN-JALOUSTRE (H.)

MM.

Maladies infectieuses	(BASTIN (R.) (DUPONT (V.)
Médecine légale	(DEROBERT (L.), Pr. s. ch. (FOURNIER (E.) (GUENIOT (M.) (HADENGUE (A.)
Médecine du Travail	ALBAHARY (C.)
Neuro-chirurgie	PERTUISET (B.)
Obstétrique	(GRANJON (A.) (HERVET (E.) (LE LORIER (G.) (LEVY (J.) (MORIN (P.) (MUSSET (R.) (ROBEY (M.) (SENEZE (J.) (SUREAU (C.) (THOYER-ROZAT (J.)
Ophtalmologie	(BREGEAT (P.) (DUBOIS (A.) (SARAUX (H.)
Orthopédie	(JUDET (R.) (MEARY (R.) (POSTEL (M.) (RAMADIER (J.)
Oto-rhino-laryngologie	(DEBAIN (J.) (PIALOUX (P.)
Parasitologie	(GOLVAN (Y.) (LAPIERRE (J.)
Pathologie chirurgicale	(BARCAT (J.) (BINET (J.-P.) (CAUCHOIX (J.) (CERBONNET (G.) (CHATELIN (C.-L.) (DUBOST (Ch.) (DUBOST (Cl.) (FAUREL (J.) (FLABEAU (F.) (GARBAY (M.) (GARNIER (H.) (GAUDART d'ALLAINES (Cl. de) (GERMAIN (A.) (LATASTE (J.) (LEVEQUE (B.) (LOYGUE (J.) (MERCADIER (M.) (NATALI (J.) (PELLERIN (D.) (PERROTIN (J.) (ROBERT (H.) (THOMERET (G.)

MM.

Pathologie exotique	SCHNEIDER (J.)
Pathologie expérimentale	(BENHAMOU (J.-P.)
	(BERTHAUX (P.)
	(BOIVIN (P.)
	(CROSNIER (J.)
	(HARTMANN (L.)
	(LOEPER (J.)
	(MAURICE (J.)
	(MIKOL (Cl.)
	(RICHET (G.)
Pathologie médicale	(AUSSANNAIRE (M.)
	(BOUVIER (J.)
	(BOUVRAIN (Y.)
	(BRICAIRE (H.)
	(BRISSAUD (H.)
	(BROCARD (H.)
	(BUGE (A.)
	(CATINAT (J.)
	(CHRETIEN (J.)
	(COBLENTZ (B.)
	(CONTAMIN (F.)
	(COURY (C.)
	(ETIENNE (J.-P.)
	(FREZAL (J.)
	(FRITEL (D.)
	(HENNEQUET (A.)
	(HIMBERT (J.)
	(HOUSSET (E.)
	(LAROCHE (Cl.)
	(LESOBRE (R.)
	(MACREZ (C.)
	(MOREAU (L.)
	(NICK (J.)
	(ROYER (P.)
	(TOURNEUR (R.)
	(WOLFROMM (R.)
Pédiatrie-Puériculture	(JOSEPH (R.)
	(LAFOURCADE (J.)
	(LEPERCQ (G.)
	(MANDE (R.)
	(MOZZICONACCI (P.)
	(POLONOVSKI (C.)
	(ROSSIER (A.)
	(VIALATTE (J.)
Pharmacologie	(BOISSIER (J.)
	(LECHAT (P.)
Physiologie	(BARRES (G.)
	(DEJOURS (P.)
	(DURAND (J.)
	(GIRARD, M. conf.
	(HUGELIN (A.)
	(SCHERRER (J.)

	MM.
Physique médicale	CHANTEUR (J.) GOUGEROT (L.), M. conf., Pr. s. ch. GREMY (F.), M. conf. MILHAUD (G.) PELLERIN (P.) ROUCAYROL (J.-Cl.) TUBIANA (M.), M. conf.
Pneumo-phtisiologie	KREIS (B.) MEYER (A.) RENAULT (P.)
Psychiatrie	PICHOT (P.)
Psychiatrie infantile	DENIKER (P.) DUCHE (D.) FLAVIGNY (H.) LAPRESLE (J.)
Rhumatologie	DELBARRE (F.)
Stomatologie	CERNEA (P.) CHAPUT (Mme A.), M. conf. agr. GRELLET (M.)
Thérapeutique	CHASSAGNE (P.) LAMOTTE (M.) MARCHE (J.)
Urologie	AUVERT (J.) MOULONGUET (A.) QUENU (L.)

III.- PROFESSEURS SANS CHAIRE ET AGREGES CHARGES DE COURS DE CLINIQUE ANNEXE à titre permanent.

	MM.
Anatomie	DEBEYRE (J.)
Clinique chirurgicale	ABOULKER (P.) AMELINE (A.), Pr. s. ch. VERNE (J.-M.)
Clinique médicale	PERRAULT (M.) RAMBERT (P.) THIEFFRY (S.)
Clinique obstétricale	GRASSET (J.) MAYER (M.)
Clinique ophtalmologique	DESVIGNES (P.) OFFRET (G.)
Clinique oto-rhino-laryngologique	MADURO (R.)
Clinique pédiatrique et puériculture	LAPLANE (R.)
Clinique psychiatrique	BARUK (H.)
Clinique urologique	KUSS (R.)

IV.- PROFESSEURS DÉTACHÉS DANS LES UNIVERSITES ETRANGERES

MM.

Bactériologie ..... HAUDUROY (P.), Pr. s. ch.
Pathologie chirurgicale ..... RUDLER (J.), Pr. s. ch.

V.- CHARGÉS DE COURS D'HYGIÈNE SCOLAIRE ET UNIVERSITAIRE

MM. BOLTANSKI (E.)
LAUNAY (C.)

Secrétaire général de la Faculté ..... M. LENA (J.)

Secrétaire principal ..... Mlle CHAINTREUIL (G.)

Conservateur en Chef de la Bibliothèque
Conservateur du Musée d'Histoire de la Médecine ..... M. le Docteur HAHN (A.)

Conservateur ..... Mlle DUMAITRE (P.)

Bibliothécaires ..... (Mmes CONTET (J.),
(FORGET (F.),
(Mlles LAURENT (H.),
(LE NOIR (G.),
(QUIEVREUX (E.)

Par délibération en date du 9 Décembre 1798, l'Ecole a arrêté que les opinions émises dans les dissertations qui lui seront présentées doivent être considérées comme propres à leurs auteurs et qu'elle n'entend leur donner aucune approbation ni improbation.

A NOTRE PRESIDENT DE THESE

Monsieur le Professeur Pierre MOLLARET

Professeur de Clinique
à la Chaire des Maladies Infectieuses

Médecin de l'Hôpital Claude-Bernard

Membre de l'Académie de Médecine

A nos remerciements pour avoir accepté la présidence de cette thèse, s'ajoute notre gratitude pour la bienveillance qu'il veut bien nous témoigner.

A Monsieur le Professeur Jacques TREFOUËL

Directeur de l'Institut Pasteur

Membre de l'Institut

Membre de l'Académie de Médecine

Qui nous a admisæ à l'Institut Pasteur et a bien voulu nous donner la preuve de son estime pour notre travail.

A Monsieur le Docteur Hubert MARNEFFE

Sous-Directeur de l'Institut Pasteur

Membre de l'Académie de Médecine

En le remerciant de l'intérêt qu'il a attaché à l'achèvement de cette thèse.

A Monsieur le Docteur Louis AUBLANT

Secrétaire Général de l'Institut Pasteur

Membre de l'Académie de Médecine

Qui nous a aidée et conseillée en toutes circonstances avec tant de bienveillance et d'affabilité ; nous l'assurons de notre profonde gratitude.

A Monsieur le Docteur Julien DUMAS

Chef de Service honoraire à l'Institut Pasteur

Notre Maître, qui nous a formée aux disciplines microbiologiques, dont l'exemple et les conseils nous ont été et nous restent précieux, qu'il trouve ici le témoignage de notre fidèle et respectueuse amitié.

Au Professeur Pierre MOCQUOT

Professeur Honoraire à la Faculté de Médecine

Médecin Honoraire de l'Hôpital Broca

Membre de l'Académie de Médecine

Membre de l'Académie de Chirurgie

Que le Maître et le Parent trouvent ici l'expression de notre affectueuse admiration et de notre profonde gratitude pour son enseignement et son exemple, comme homme et comme Médecin.

A Monsieur le Docteur Pierre THIBAULT

Chef de Service à l'Institut Pasteur

Directeur du Cours de Microbiologie

Des années de collaboration nous permettent de lui exprimer notre attachement et notre reconnaissance pour son enseignement quotidien.

A N O S C A M A R A D E S

et en particulier

A TOUS CEUX DES SERVICES DE MICROBIOLOGIE GENERALE ET TECHNIQUE

avec lesquels nous collaborons chaque jour très amicalement.

A MA FAMILLE ET A MES AMIS

P L A N

I - INTRODUCTION.

II - HISTORIQUE.

- Données biologiques.
- Données biochimiques.

III - RECHERCHES PERSONNELLES.

A - Entrée en matière.

B - Etude en eau peptonée.

C - Etude en milieu synthétique citraté avec du glucose comme source accessoire de carbone :

1)- Qualitative en milieu solide.

2)- Qualitative en milieu liquide.

3)- Analyse quantitative.

D - Etude de quelques souches "citrate-négatives".

IV - CONCLUSIONS.

= I =

INTRODUCTION

La tribu des Entérobactéries est formée de germes très variés ; on cherche de plus en plus des tests rapides, permettant de séparer ces bactéries par des techniques simples, mettant les identifications bactériennes même poussées à la portée de tous les biologistes, notamment de ceux ayant des activités très variées comme on en a dans un laboratoire d'analyses médicales.

Dans ce vaste groupe, l'utilisation de l'acide citrique joue un rôle important dans le diagnostic, séparant d'une part les Salmonella et les Arizona, les Escherichia freundii (Bethesda-Ballerup), les Klebsiella, les Enterobacter et les Serratia qui utilisent le citrate dans un milieu simple (de KOSER (13) ou de SIMMONS (27)), d'autre part les Escherichia et les Shigella, qui ne poussent pas dans ces conditions.

Ces dernières années, des milieux ont été proposés qui, parmi les souches incapables de cultiver en milieu synthétique avec citrate, séparent deux groupes : l'un dont les membres sont capables d'utiliser l'acide citrique, et l'autre où ils sont incapables de cette activité. Il s'agit de milieux empiriques en ce sens que, malgré l'extrême précision de leur composition (HAJNA (12) et CHRISTENSEN (6)), ils contiennent de l'extrait de levure, qui apporte à peu près tous les éléments contenus dans une peptone ou un extrait de viande, notamment des acides aminés, des vitamines et des bases puriques et pyrimidiques.

Nous nous sommes demandé les causes du comportement différent de

germes en somme très proches en milieu synthétique et en milieu complexe, et quels étaient les facteurs indispensables à cette utilisation de l'acide citrique.

L'objet de ce travail est donc essentiellement : dans quelles conditions Escherichia coli et accessoirement certaines bactéries voisines peuvent prendre le citrate comme source de carbone, et quels facteurs sont indispensables pour cette activité.

= II =

HISTORIQUE

Notre bibliographie comprend deux parties bien distinctes :

- Dans la première, nous avons réuni les principaux travaux concernant l'étude des cultures en présence de citrate des différentes variétés d'Entérobactéries : milieux empiriques, puis milieux synthétiques, avec un retour relativement récent vers des milieux plus complexes, dits semi-synthétiques, adaptés à l'étude d'autres aspects du problème.

- Dans une deuxième partie, nous avons rassemblé quelques notes prises dans des travaux dus à des biochimistes ; nous avons voulu montrer que ce problème de l'utilisation de l'acide citrique a été étudié par des méthodes très différentes de celles que nous employons, cependant avec des résultats comparables.

Ces études de biochimistes sont, à vrai dire, faites dans des conditions très différentes des méthodes employées par les biologistes , puisqu'il ne s'agit pas de germes se multipliant dans un milieu favorable,mais de germes non proliférants, en suspension physiologique ou desséchés, ou même de bactéries traitées après dessiccation par des agents physiques ou des solvants organiques.

o

o o

Première Partie

REVUE DU PROBLEME DE L'UTILISATION DE L'ACIDE CITRIQUE PAR LES BIOLOGISTES

Nous avons repris la bibliographie des milieux mis au point pour l'étude de l'action des Entérobactéries sur l'acide citrique.

Il nous faut d'abord dire toute l'importance actuelle de ce test ; la culture sur un milieu synthétique simple où le citrate est la seule source de carbone sépare les Entérobactéries en "citrate +" et "citrate -".

Certaines souches se développent en donnant une culture alcaline, ce sont les "citrate +" ; les autres ne donnent aucune culture, ce sont les "citrate -".

Poussent sur ce type de milieu :

1)- les Salmonella dans leur ensemble, à l'exception d'assez rares sérotypes (dont S. typhi et le Paratyphique A) ;

2)- les Arizona, germes proches des Salmonella par la majorité de leurs caractères biochimiques, mais qui s'en différencient par certaines fermentations sucrées, par leur action sur la gélatine et la présence fréquente d'une β galactosidase (15) ;

3)- les Escherichia freundii avec leurs variétés lactose-négatives, Bethesda-Ballerup, ressemblant aux Salmonelles par beaucoup de leurs caractères, mais s'en différenciant par la culture positive en présence de cyanure de potassium et l'absence de lysine-décarboxylase ;

4)- les Klebsiella immobiles et les Enterobacter cloacae et aerogenes, desquels on peut rapprocher les Serratia, tous germes qui, au contraire des espèces déjà signalées, ne produisent pas d'hydrogène sulfuré et ont une réaction au rouge de méthyle négative, tandis que la recherche de l'acétylméthylcarbinol est positive.

A propos de ces deux derniers tests, il faut parler de l'I.M.Vi.C., ensemble de quatre réactions majeures (PARR, 1936 (20)) :

I = Recherche de l'indole ;

M = Recherche de la modification de pH, mise en évidence par le rouge de méthyle dans un milieu glucosé ;

V = Réaction de Voges-Proskauer pour la mise en évidence de l'acétylméthylcarbinol ;

C = Culture ou non sur milieu synthétique avec le citrate comme source de carbone.

La combinaison de ces quatre réactions sépare le groupe Enterobacter, dont nous venons de parler : I-, M-, V+, C+, du groupe Escherichia coli : I+, M+, V-,C-.

Dès 1892, Van ERMENGEN et Van LAER (28) avaient montré que le bacille du colon pouvait dégrader les acides organiques : formique, succinique, citrique ou tartrique, en hydrogène, gaz carbonique et méthane.

MAASSEN (18), en 1895, étudiait l'utilisation des acides organiques les plus courants en les ajoutant à un milieu de base contenant de la peptone et des sels minéraux. Le trouble plus abondant et l'apparition d'une réaction alcaline sont les témoins d'une réaction positive, c'est-à-dire de l'utilisation de ces acides.

Premières études en milieu synthétique

En 1896, CAPALDI et PROSKAUER (5) emploient, les premiers, un milieu synthétique pour une étude de ce genre. Leur milieu était additionné de sels ammoniacaux d'acides organiques variés ; mais leurs expériences sont difficiles à interpréter et on ne sait pas exactement quelles sont les souches qu'ils utilisaient.

En 1914, ALTOBELLI, confirmant et complétant les travaux de MAASSEN, étudie la transformation en carbonates de divers acides organiques dont l'acide citrique.

A ce propos, AYERS et RUPP, en 1918 et 1919 (1, 2), font un travail sur l'utilisation simultanée du glucose et des sels d'acides organiques et montrent que la réversion vers l'alcalinité, observée avec certains germes dans les milieux sucrés, n'est pas due, comme on le pensait, à la formation d'ammoniaque, mais à celle de carbonates et de bicarbonates, à partir d'acides organiques ; ces sels sont peu abondants, si la seule source de carbone est le glucose, mais importants s'ils dérivent d'un acide fourni tout prêt à la bactérie.

BROWN (4), en 1921, fait une série d'observations en se servant d'une solution de citrate de soude préparée primitivement pour la récolte des échantillons de sang : bouillon citraté à 1 %, qui, dit-il, favorise certaines espèces microbiennes. Pour contrôler l'utilisation du citrate, il emploie la technique servant à la lecture du milieu au d-tartrate : il ajoute de l'acétate de plomb à une culture de 48 heures dans son milieu ; si le citrate n'est pas utilisé (ou dans un milieu neuf), il se forme un précipité abondant ; s'il reste peu de citrate, au contraire, le précipité de citrate de plomb est minime.

Milieux sélectifs

La même année - 1921 -, PESCH (22) étudie la préparation de milieux sélectifs pour les germes du groupe "Coli-Aerogenes". Il fournit une seule source de carbone : d-tartrate ou citrate, et montre que le bacille du colon et l'aérogenes poussent tous les deux en présence de tartrate, tandis que seul l'aerogenes pousse en présence de citrate comme seule source de carbone.

Voici donc, pour la première fois, mis en évidence ce test de l'utilisation du citrate en milieu synthétique, test qui est maintenant d'une importance primordiale pour la séparation des espèces à l'intérieur de la famille des Entérobactériacées.

Milieu de KOSER

En 1923, KOSER (13) met au point un milieu de base, milieu minéral sans carbone, contenant des sels inorganiques ; si, à ce milieu, dans le-

quel ni "Bacterium coli" ni "Bacterium aerogenes" ne poussent, on ajoute du glucose ou du lactose à une concentration de 0,2 %, les deux germes donnent une culture abondante.

Pour essayer l'action des sels organiques, il choisit des souches d'Escherichia coli typiques, donnant de l'indole-rouge de méthyle positives, Voges-Proskauer négatives ; de la même façon, il précise que ses souches d'Aerobacter étaient indole-négatives, n'acidifiaient pas le milieu glucosé de façon définitive et produisaient de l'acétone. Si on remplace le glucose ou le lactose par de l'acide citrique, le "Bacterium coli"ne se développe pas dans ce milieu synthétique, tandis que "Bacterium aerogenes" donne une culture abondante en 24 heures.

En réalité, en 1931, RUCKHOFT et ses collaborateurs (24) montrent qu'Escherichia coli se multiplie dans le milieu de Koser, d'ailleurs extrêmement peu (on peut même se demander si l'importance de l'inoculum n'était pas suffisante pour expliquer cette multiplication aux dépens des germes inoculés), mais la survie est longue et on a pu repiquer des cultures encore vivantes au bout d'une année.

Milieu de SIMMONS

En 1926, SIMMONS propose une modification du milieu de KOSER ; il y ajoute de la gélose et un indicateur de pH : le bleu de bromothymol.

Cette modification, qu'il présente très simplement comme une simple recette de laboratoire, est cependant d'une très grande portée pratique : la lecture devient ainsi très simple ; en effet, l'utilisation du citrate se traduit à la fois par le développement d'une culture plus facile à apprécier sur milieu solide que dans le milieu liquide de Koser et par une modification de la teinte du milieu ; de vert au départ, il devient bleu d'outre-mer, modification du pH qui traduit l'alcalinisation produite par l'utilisation de l'acide citrique.

Voici la formule de ce milieu :

Sulfate de magnésium	0,2 g
Phosphate mono-ammoniacal	1 g.

Phosphate bi-potassique ..... 1 g.
Chlorure de sodium ..... 5 g.
Gélose ..... 15 g.
Bleu de bromothymol ..... 0,08 g.
Eau distillée ..... 1.000 ml.

Après dissolution des produits et filtration sur papier, on répartit en tubes de 17 mm. à raison de 6 ml. environ ; on stérilise à l'autoclave à 112°-115° pendant 20 minutes.

Pour l'utilisation, on fait fondre le nombre de culots dont on a besoin et on les incline pour avoir une pente.

Ensemencer en strie à partir d'un milieu solide ; mettre à l'étuve sans capuchonner.

Malgré l'obtention, par PARR et SIMPSON (21), en 1940, d'Escherichia coli poussant sur milieu de Simmons (après plusieurs passages sur milieu d'Endo), le développement de germes ou leur absence de culture sur le milieu de Simmons ou dans le milieu de Koser constitue un des meilleurs tests différentiels entre les Escherichia d'une part et, d'autre part, les Enterobacter et les Klebsiella.

Utilisation de l'acide citrique par Escherichia coli.

En 1947, LOMINSKI et ses collaborateurs (17) montrent qu'il existe une utilisation de l'acide citrique par Escherichia coli.

Ils prennent comme test d'utilisation la diminution de la quantité de citrate contenue dans un milieu après qu'une culture d'Escherichia coli y ait été ensemencée et s'y soit développée.

- Si LOMINSKI utilise un milieu synthétique simple, contenant du phosphate d'ammonium, du glucose et du citrate, le taux d'acide citrique reste inchangé,

- Tandis que, dans un milieu contenant 0,1 % d'asparagine, il utilise en 48 heures 15 % de l'acide citrique (Aerobacter, dans les mêmes conditions, en utilise 94 %).

- Enfin, LOMINSKI trouve que, en milieu peptoné ordinaire, la consommation de citrate par les Escherichia est très élevée (environ 94 %),

tandis que, dans le même milieu, celle d'Aerobacter n'est que de 60 %.

LOMINSKI apporte ainsi la preuve que Escherichia coli consomme de l'acide citrique, mais à condition que les conditions de culture soient différentes de celles offertes au germe dans un milieu type Koser ou Simmons.

En 1950, REESE, VAUGHN et leurs collaborateurs (23) prouvent que le citrate est transformé par Escherichia coli, à condition d'être associé à une autre source de carbone : ils essaient une vingtaine de composés organiques, qui sont tous actifs (à l'exception du formate de calcium) ; les plus intéressants, parce que actifs à petites doses, sont :

- la peptone à 0,5 pour 100,
- le glucose ou le lévulose à 0,1 pour 100,
- l'asparagine à 0,5 pour 100.

Milieu de CHRISTENSEN

En 1949, W. BLAKE CHRISTENSEN (6) propose un milieu complexe pour l'étude de l'action des coliformes sur le citrate et la production d'hydrogène sulfuré.

Il explique l'intérêt d'un milieu de ce genre en discutant les raisons pour lesquelles un germe est incapable d'utiliser le citrate dans le milieu de Koser :

- Il peut ne pas posséder le système enzymatique nécessaire ;
- Le milieu synthétique simple peut être dépourvu d'un élément indispensable à la culture du germe : un facteur de croissance, par exemple, ou une source d'azote organique.

Ce milieu contient, en plus, des sels minéraux, du citrate, mais aussi du glucose, de la cystéine et de l'extrait de levure. La version originale contenait aussi un indicateur d'SH_2, sous forme de sels de fer; mais, actuellement, beaucoup d'auteurs préfèrent réserver ce milieu pour la seule recherche de l'action du germe sur le citrate, et la formule modifiée par EDWARDS est la plus couramment employée. La voici :

Citrate de soude ..... 3 g.

Glucose ..... 0,2 g.

Extrait de levure	0,5 g.
Chlorhydrate de cystéine	0,1 g.
Phosphate monopotassique	1 g.
Chlorure de sodium	5 g.
Rouge de phénol	0,012 g.
Gélose	15 g.
Eau distillée	1.000 ml.

Le pH n'est pas ajusté. Autoclavage à 115° pendant 15 minutes.

En étudiant le tableau de CHRISTENSEN, on a l'impression que la présence ou l'absence de cystéine modifie peu les réactions du milieu, tandis que, en l'absence d'extrait de levure, un certain nombre de germes : Salmonella typhi, Salmonella pullorum et Salmonella paratyphi A, ne se développent pas.

Pour étudier l'action d'une souche, après avoir réparti le milieu sur une hauteur d'environ 4 cm. en tubes de 17 mm., on l'incline de façon à avoir une pente et un culot.

Toutes les souches, sur ce milieu qui contient de l'extrait de levure, cultivent, mais l'utilisation du citrate se traduit par une alcalinisation du milieu qui, de jaune-orange, vire au rouge avec souvent un reflet violacé ; le seul inconvénient est que cette alcalinisation n'est pas rapide et se produit généralement en 48 heures seulement, alors que les réactions positives sur le citrate de Simmons sont souvent très rapides (A noter que les souches citrate + sur milieu de Simmons sont aussi rapidement positives sur citrate de Christensen).

Importance pratique de ce milieu.

Ce milieu de CHRISTENSEN est d'un intérêt de tout premier plan pour les laboratoires travaillant surtout les Entérobactéries :

Si Escherichia coli, dans sa forme la plus banale : lactose positive et gazogène, ne pose, en effet, pas de problème de diagnostic différentiel avec les autres Entérobactéries citrate-négatives sur milieu de Simmons, il en est autrement du groupe Alkalescens-Dispar.

Alkalescens-Dispar est en effet une variété immobile, lactose négative et non gazogène, souvent très difficile à distinguer de certains types des Shigella ; le seul autre critère biochimique est la lysine-décarboxylase (positive pour les Alkalescens, négative pour les Shigella).

En 1958, un travail de Szymona SZTURM-RUBINSTEN (25) montre que les Shigella sont toujours citrate-négatives sur le milieu de Christensen, comme elles le sont sur le milieu de Simmons, mais que, pour les germes du groupe des Escherichia coli et les Alkalescens-Dispar, sur 98 souches étudiées, 8 seulement n'utilisent pas le citrate ; c'est dire la grande utilité pratique de ce test pour distinguer les Shigella de certains coliformes immobiles et anaérogènes.

Rôle de l'asparagine.

Dans le même article, cet auteur montre que, si on utilise un milieu de Simmons additionné d'asparagine, les résultats obtenus sont différents : certaines Shigella poussent dans ces conditions en alcalinisant le milieu, c'est-à-dire qu'elles utilisent l'acide citrique (16 souches sur 39 étudiées) ; mais, parmi les Alkalescens et les Coliformes, il reste encore des souches qui sont citrate-négatives.

Il faut noter que, sur ce milieu à l'asparagine, comme sur le milieu de Simmons, le résultat est positif quand il y a une culture accompagnée d'une alcalinisation du milieu ; s'il n'y a pas de culture ou s'il existe une culture maigre sans changement de teinte, le résultat est négatif.

o

o o

Deuxième Partie

NOTIONS SUCCINCTES SUR LES ETUDES DE BIOCHIMIE

Des études tout à fait indépendantes de celles des microbiologistes, poursuivies sur des germes en cultures des études d'action enzymatique, ont été entreprises.

Les bactériologistes montrent que Escherichia coli est capable d'utiliser l'acide citrique à condition d'être cultivé dans un milieu où le germe ait tout ce qui lui est nécessaire pour pouvoir se développer ; les biochimistes contribuent à l'étude d'un autre aspect du problème ; ils s'intéressent à l'aspect physiologique de la question et à la recherche des voies de cette biosynthèse.

SZULMAJSTER, Marianne GRUNBERG-MANAGO et Colette DELAVIER, en 1952 (26), avaient montré que l'utilisation du citrate par Escherichia coli était le fait d'une adaptation enzymatique, et ils pensaient que cette utilisation pouvait se faire par une voie différente du cycle de Krebs.

DUGLEY et DAWES (8), en 1953, pensent aussi qu'il existe d'autres voies de biosynthèse.

LARA et STOKES, en 1952 (14), ont mis en évidence l'oxydation du citrate en utilisant des germes desséchés et broyés, mais n'ont pu obtenir le même résultat avec des germes vivants. Cependant, il est important de remarquer que leurs expériences se déroulent dans un laps de temps très court, qui ne leur permet évidemment pas de tenir compte de l'adaptation enzymatique.

En 1954, FOULKES (10) trouve que des cellules d'Escherichia coli, traitées par congélation et décongélation successives, ne sont pas pour autant capables d'utiliser l'acide citrique, mais acquièrent cette propriété après un traitement supplémentaire au chloroforme.

WHEAT, DONALD, WONG et AGL, en 1954 (29), puis, en 1955, WHEAT et

AGL (30) montrent que l'utilisation du citrate se fait par le cycle de Krebs et aussi en anaérobiose en l'absence de coenzyme A.

D'autre part, des travaux comme ceux de MAC DONALD et GERHART, en 1958 (19) montrent que 20 % du citrate environ pénètre dans l'espace cellulaire.

Avec une souche de Pseudomonas fluorescens, BARRET, LARSON et KELLIS (3) avaient montré l'importance de l'adaptation enzymatique dans l'étude de ces phénomènes :

- Si on utilise des germes cultivés sur fumarate, il faut une période d'adaptation pour qu'ils soient capables d'utiliser l'acide citrique ;
- Mais si on utilise des cellules desséchées, l'oxydation du citrate est immédiate. La nécessité d'une période d'adaptation est, pensent-ils, due à une imperméabilité de la membrane.

o
o o

Conclusions

De cette revue bibliographique, il nous semble que les conclusions sont les suivantes.

Des cellules d'Escherichia coli intactes sont incapables d'utiliser l'acide citrique comme seule source de carbone, alors que les germes, cependant très voisins que sont les Klebsiella et les Enterobacter, font cette oxydation sans difficulté.

Cependant, de ces germes on peut extraire des enzymes capables de dégrader l'acide citrique ; si cette utilisation nécessite des conditions particulières pour se produire, on peut penser, avec BARRET et ses collaborateurs, qu'il s'agit d'une particularité liée à l'imperméabilité de la membrane.

C'est à ce propos qu'il nous semble particulièrement important de citer les travaux de GALL en 1947 (11), puis ceux de COHEN et MONOD en 1957 (7), mettant en évidence la différence de pénétration des molécules selon les conditions de culture ; c'est ainsi que l'acide glutamique pénètre dans la cellule (en milieu synthétique) seulement s'il y a du glucose dans le milieu.

Le glucose, d'après GALL, semble agir comme source d'énergie pour le transfert de l'acide glutamique. COHEN et MONOD pensent qu'on pourrait invoquer un mécanisme de transfert particulier.

Dans ce même article sur les phénomènes de perméation, COHEN et MONOD, parlant du problème de l'utilisation du citrate chez Aerobacter, rapportent un travail de GREEN et DAVIS montrant que le glucose inhibe l'enzyme adaptatif qui permet la pénétration du citrate dans la bactérie. Ils citent de nombreux travaux où les auteurs, comme ceux dont nous avons résumé les travaux, montrent l'existence d'un cycle de Krebs chez Escherichia coli et pensent que ce germe est incapable de synthétiser le système perméase approprié à la pénétration du citrate dans la cellule.

Ces deux ordres de notions apportent une conclusion unique :

Certains germes des Entérobactéries utilisent l'acide citrique dans un milieu synthétique simple ; d'autres comme Escherichia coli ont besoin d'un milieu complexe. On peut rapprocher ce phénomène de celui qu'on étudie par des techniques très voisines, la transformation de l'urée, rapide en milieu synthétique par les Proteus, ou nécessitant une culture sur un milieu complexe comme c'est le cas pour les Klebsiella.

= III =

RECHERCHES PERSONNELLES

- A -

GENERALITES

Nous avons eu l'occasion d'utiliser fréquemment, ces dernières années, le milieu de CHRISTENSEN (modifié par EDWARDS) avec des résultats très constants. Mais il nous a semblé qu'un milieu synthétique rendant des services analogues présenterait un double intérêt :

1)- Théorique, puisqu'il permettrait peut-être de différencier des souches cultivant toutes d'une façon analogue sur milieu de Christensen ;

2)- Pratique aussi, puisqu'il renseignerait sur un caractère supplémentaire d'un germe donné.

Rôle des différents composants du milieu de Christensen

En donnant la composition de son milieu, CHRISTENSEN explique que, pour la plupart des germes, et en tout cas pour ceux que nous voulons étudier, la présence ou l'absence de cystéine a peu d'importance ; par contre, il pense que l'extrait de levure contient un "facteur de croissance" qui n'existerait pas dans toutes les peptones et permettrait la culture des germes fragiles. Ceci est absolument indéniable pour toutes les souches incapables de faire la synthèse d'une vitamine, d'un acide aminé ou d'une base purique ou pyrimidique ; l'extrait de levure contient, en effet, presque tous ces éléments ; l'inconvénient est alors, pour une

étude théorique, de ne pas savoir quel est le facteur intéressant.

Nous avons pensé qu'il serait possible d'utiliser, comme source d'énergie associée seule au citrate, celle qui est la plus banale puisqu'elle est utilisée par le plus grand nombre de germes : le glucose.

L'hypothèse de GALL (11), citée dans la première partie de ce travail, nous a semblé pouvoir aussi s'appliquer au cas du citrate.

HAJNA (12) reprochait à cette addition du glucose (à un milieu déjà complexe) le fait que toutes les Entérobactéries, et en particulier les Escherichia, poussent en présence de ce glucide en acidifiant le milieu. Ceci ne nous paraît pas un obstacle ; d'une part, nous avons la garantie que nous fournissons une source de carbone que nous savons devoir être utilisable dans tous les cas ; d'autre part, d'un point de vue pratique, l'utilisation du glucose n'est pas gênante, car si le citrate est en quantité suffisante, son utilisation devra se traduire par une alcalinisation du milieu.

Notre plan de travail est le suivant :

1/- Préparer un milieu synthétique où le glucose et le citrate soient associés dans des proportions telles que le glucose favorise le départ de la culture sans être trop abondant pour empêcher l'alcalinisation du milieu qui traduira l'utilisation du citrate.

2/- Utiliser ce milieu pour des souches citrate-négatives sur milieu de Simmons ; voir quel rôle il peut jouer à côté des milieux déjà connus.

3/- Si notre milieu se montre satisfaisant par les résultats qu'il fournit, comment se pose le problème des souches qui demeurent citrate-négatives.

o

o o

- B -

ETUDE PRELIMINAIRE EN EAU PEPTONEE

Avant de faire notre étude en milieu synthétique, en nous servant des notions mises en évidence par MAASSEN (18) en 1895, nous avons fait quelques essais sur l'utilisation du citrate en eau peptonée. Le procédé qui nous a paru le plus simple, pour des essais comportant un petit nombre de souches, était de diluer au 1/2 l'eau peptonée que nous utilisons habituellement (C'est un milieu à 10 %ode peptone) ; la dilution au quart nous donne du reste des résultats identiques.

Cette eau peptonée à 5 ou 2,5 pour 1000 est répartie sous le volume de 2 ml. en tubes de 12 mm.. Les tubes sont additionnés de citrate de soude à 10 % en solution dans l'eau distillée (solution qui est stérilisée à part). Nous avons fait nos essais avec I goutte, V gouttes et X gouttes de la solution. V gouttes (environ 1/1000 comme concentration finale) est la quantité qui nous a semblé la plus satisfaisante.

Comme BROUN (4), nous avons mis en évidence la présence ou l'absence de citrate par la recherche d'un précipité de citrate de plomb, en ajoutant, après 48 heures de culture, 1 ml. d'une solution saturée d'acétate de plomb. C'est d'ailleurs une technique dont parle KAUFFMAN et dont il semble satisfait.

Le comportement des germes dans ce milieu n'a été examiné qu'avec sept souches, car nous avons vu que ses résultats étaient comparables à ceux obtenus sur milieux semi-synthétiques, malgré l'opinion de CHRISTENSEN au sujet des peptones et de la supériorité que présente l'extrait de levure.

Notre souche témoin est un Aerobacter (souche A 240 de la collection de l'Institut Pasteur) qui utilise l'acide citrique en milieu synthétique (type Koser ou Simmons). Le témoin négatif est un tube non ensemencé.

Les autres souches étaient un Escherichia coli typique et deux Alka-

lescens Dispar, une souche A-D 0 1 et l'autre de A-D 0 3 et trois Proteus : deux Proteus vulgaris et un mirabilis. Ces cinq souches ne cultivent pas sur le milieu de Simmons.

Voici les résultats que nous avons obtenus :

Aerobacter : très peu de précipité ..... citrate utilisé

Escherichia coli : peu de précipité ..... citrate utilisé

A-D 0 3 : peu de précipité ..... citrate utilisé

Proteus vulgaris : précipité moyen ..... citrate partiellement utilisé

A-D 0 1 : précipité moyen ..... citrate partiellement utilisé

Proteus mirabilis : précipité identique au témoin négatif ; pas d'utilisation du citrate.

Cette méthode, qui nous avait intéressée pour une étude quantitative, a l'avantage d'être très simple, mais elle est en réalité peu précise et la complexité du milieu ne permet pas d'hypothèse sur la valeur des résultats recueillis.

Aussi, avons-nous renoncé à cette technique, pour employer exclusivement un milieu synthétique.

o

o o

- C -

RECHERCHES EN MILIEU SYNTHETIQUE QUAND DU GLUCOSE EST FOURNI A LA BACTERIE COMME SOURCE D'ENERGIE POUR L'UTILISATION DE L'ACIDE CITRIQUE

Après divers essais, utilisant tous deux sources de carbone : le citrate et le glucose destiné à fournir une source d'énergie, après avoir essayé et comparé divers milieux synthétiques de base, nous sommes revenue au milieu de Simmons qui nous a semblé convenir parfaitement pour cette étude.

A partir de cette base saline, nous avons préparé un premier milieu

gélosé, pour avoir une réponse qualitative sur la capacité de nos souches à utiliser ou non l'acide citrique dans les conditions de nos expériences.

Dans un deuxième temps, en utilisant des techniques différentes, nous avons cherché à voir, pour les souches qui utilisent l'acide citrique, de quel type était cette utilisation.

Enfin, nous avons essayé, par l'étude de courbes de croissance, d'avoir une idée de l'aspect quantitatif du problème.

1)- ETUDE QUALITATIVE SUR MILIEU SYNTHETIQUE GELOSE.

Préparation du milieu

La base utilisée est celle du milieu de SIMMONS; c'est dire qu'elle ne comprend que des sels minéraux ; nous rappelons la formule :

Sulfate de magnésium	0,2 g.
Phosphate bipotassique	1 g.
Phosphate mono-ammoniacal	1 g.
Chlorure de sodium	5 g.
Rouge de phénol	0,015 g.
Gélose	15 g.
Eau distillée	1000 ml.

Cette base contient donc une source d'azote, mais aucune source de carbone.

Technique de préparation

On peut se servir d'une gélose en poudre industrielle ; nous avons l'habitude de préparer la nôtre de la façon suivante :

Après l'avoir pesée, on la lave, enveloppée d'une gaze, à l'eau courante pour la débarrasser de ses impuretés ; on prolonge cette opération pendant 24 heures. La gélose séjourne ensuite pendant encore 24 heures dans l'eau distillée, qu'on renouvelle à trois ou quatre reprises dans la journée. On la pèse après l'avoir essorée, pour connaître la quantité d'eau

absorbée par la gélose ; en général, 15 grammes de gélose ont retenu environ 100 grammes d'eau ; ce poids sera retranché de la quantité d'eau nécessaire pour la préparation du milieu, pour éviter une dilution des divers sels.

On fait chauffer la quantité d'eau distillée nécessaire ; on y dissout la gélose et les sels minéraux, puis on ajoute le rouge de phénol ; la teinte du milieu doit être orangée. S'il est trop alcalin ou trop acide, on peut remédier à l'erreur en ajoutant, selon le cas, un peu de l'un ou l'autre des phosphates.

Le milieu est ensuite filtré sur papier (filtre Chardin ou Durieux demi-dur), mais il n'est pas précipité à l'autoclave.

On le répartit en tubes de 17 mm., sous un volume approximatif de 6 ml. ; puis, on stérilise à l'autoclave 20 minutes à 112° C. Les tubes sont gardés en culot capuchonné pour éviter la dessiccation.

Préparation des sources de carbone

On prépare, d'autre part, des solutions de glucose à 30 % et de citrate de soude à 10 % en eau distillée. On répartit en ampoules scellées ou en tubes de 17 mm. et stérilisées à l'autoclave (20 mn. à 112°). Si les solutions sont en tubes, il est préférable de les capuchonner pour éviter la dessiccation.

La préparation séparée du milieu de base présente un avantage certain pour notre étude, puisqu'il nous permet de faire varier :

- les substances que nous étudions,
- leur concentration.

Nous avons ajouté :

1)- 3 à 4 gouttes de citrate (mesurées à la pipette Pasteur), réalisant une concentration finale d'environ 2 o/oo, voisine de celle du milieu de Koser ou de Simmons.

2)- 1 goutte de glucose, dans le même milieu de base, réalisant aussi une concentration d'environ 2 o/oo.

3)- 1 goutte de glucose et 4 gouttes de citrate dans le même tube, associant les deux sources de carbone.

On fait fondre la gélose, à laquelle on incorpore la ou les sources de carbone ; on incline ensuite les tubes ; quand ils ont fait prise, ils sont prêts à l'emploi.

On les ensemence alors en strie verticale, avec une petite quantité de semence, prélevée à partir d'une culture sur milieu solide (ceci est très important, car l'ensemencement à partir d'un milieu liquide risque d'apporter d'autres facteurs favorables au développement du germe). Les milieux préparés et inclinés ne seront pas conservés plus de quelques jours, car ensuite la dessiccation est très défavorable à l'interprétation des résultats. On peut, naturellement, quand il s'agit non plus d'essais, mais de travail courant, préparer un milieu complet d'emblée contenant la ou les sources de carbone choisies. Il suffit alors de garder les tubes en culot et capuchonnés et de les incliner au moment de l'emploi.

Lecture des résultats

Sur ces milieux, la seule présence d'une culture est l'indice d'un résultat positif. Cependant, la présence d'un indicateur (rouge de phénol dans le cas présent, mais qu'on peut remplacer par n'importe quel indicateur actif dans cette zone de pH, c'est-à-dire entre 6,4 et 8) fournit d'autres renseignements :

- Si la source de carbone est le glucose, le milieu est acidifié et, avec le rouge de phénol comme indicateur, il devient jaune ;
- Si la source de carbone est du citrate, la teinte primitive, orangée, vire au rouge violacé, puisqu'il se forme des carbonates alcalins ;
- Si le milieu contient les deux sources associées, le milieu jaunit d'abord légèrement, puis devient rouge ; cette teinte apparaît d'abord en général tout à fait en bas du tube, à l'endroit où la pente rejoint le verre pour s'étendre ensuite progressivement à tout le tube ; parfois, elle apparaît à un endroit quelconque de la pente, mais il nous semble que, dans ce cas, l'inoculum a été réparti irrégulièrement.

Dans d'autres cas, sur un fond de toutes petites colonies à peu près

incolores, on voit se détacher après quelques jours (48 heures à trois jours) des colonies peu nombreuses, ou une colonie unique. Ces colonies augmentent de volume, s'entourent d'un halo alcalin, s'étendant rapidement à tout le milieu, comme si, dans ce cas, l'utilisation du citrate était liée à l'apparition de mutants.

Nous ne rappelons pas la formule du milieu de CHRISTENSEN, modifiée par EDWARDS, qui nous sert de témoin, mais on se souviendra qu'au lieu d'être un milieu minimum, il est au contraire plus favorable pour le plus grand nombre de germes. (La formule est dans l'historique).

Souches utilisées

Nous avons travaillé avec 166 souches, toutes de la famille des Entero-bacteriaceae, mais appartenant à plusieurs groupes de cette famille.

Origine des souches

Nous ne donnons pas la provenance de chaque souche, car cette énumération ne nous a pas semblé avoir de l'intérêt pour l'étude que nous poursuivons. Signalons toutefois que l'origine en est très variée.

D'une part, certains échantillons sont des souches-tests provenant de différents auteurs et fournies par la Collection de souches microbiennes de l'Institut Pasteur ; il s'agit là d'une quinzaine de souches. Parmi les autres, un quart environ a été isolé en France, les unes à l'Institut Pasteur au cours de coprocultures ou d'autres examens, les autres envoyées au Laboratoire de Microbie générale pour identification ; les dernières, enfin, viennent soit des Instituts Pasteur hors métropole, soit de divers correspondants étrangers du Centre National des Shigella; c'est ainsi que le Viet-Nam, le Cambodge, l'Iran, l'Irak et la Turquie en Orient, l'Afrique du Nord et l'Afrique Noire ont contribué à la formation de cette petite collection.

Ces souches, à part celles qui proviennent de la collection de l'Institut Pasteur, ont été prises au hasard et, dans un travail de routine pour l'identification des souches, les quatre milieux qui nous intéressaient ont été inclus dans la série des tests effectués pour la détermination de l'espèce.

Position taxinomique de ces souches

Nous avons pris comme témoin, au cours de ces expériences, une souche de Klebsiella : la souche A 240 de la collection de l'Institut Pasteur ; c'est une souche typique de cette espèce, et, en particulier, elle utilise rapidement le citrate sur milieu de Simmons et pousse très bien sur les autres milieux que nous utilisons.

Les souches que nous avons réunies ici sont des Entérobactéries incapables d'utiliser le citrate sur milieu de Simmons :

- soit qu'il s'agisse d'un caractère constant du groupe, comme c'est le cas pour E. coli ou les Shigella ;
- soit qu'il s'agisse du caractère constant dans une espèce : cas de Proteus morganii, par exemple ;
- soit d'un test variable dans l'espèce d'une souche à l'autre.

Ces germes se répartissent ainsi :

1/- Groupe Escherichia coli :

a)- Soit des coli typiques, mobiles et gazogènes, utilisant le lactose en 24 heures, produisant de l'indole, donnant une réaction au rouge de méthyle positive et une réaction de Voges-Proskauer négative.

b)- Soit des souches atypiques par un ou plusieurs caractères : mobilité, production de gaz, fermentation du lactose ; pour un certain nombre de caractères, jamais d'anomalie n'a été notée dans les souches que nous avons rencontrées au cours de cette étude ; il s'agit de la production d'indole, de la réaction au rouge de méthyle et de la recherche de l'acétoïne. Ce sont là les anciens "paracoli", terme que nous conservons, en particulier dans les tableaux, car il conserve une utilité pratique incontestable.

c)- Soit les "Alkalescens-Dispar" ; bien que ces germes soient étroitement apparentés à Escherichia coli sous l'angle de la classification, puisque le Congrès de Bactériologie de 1958 les intègre dans ce groupe, nous avons cru pouvoir leur conserver une autonomie qui correspond à leurs rapports avec la clinique. Ce sont, de plus, des germes qui se comportent comme une entité, et leur diagnostic différentiel se pose, en pratique de

laboratoire, avec les germes du groupe Shigella ou les Salmonella immobiles et non gazogènes du groupe D.

2/- Groupe Shigella :

Un certain nombre de souches de ce groupe ont été utilisées pour ce travail ; elles étaient typiques pour tous leurs caractères : immobiles, n'utilisant ni adonitol, ni salicine, ni inositol, lactose-négatives, sauf certaines souches de Shigella sonnei, qui sont lactose-positives tardivement ; les recherches de l'uréase, de la tryptophanedésaminase et de la lysinedécarboxylase sont négatives. Ces souches, prises au hasard, sont réparties dans les quatre sous-groupes admis : dysenteriae, flexneri, boydii et sonnei.

3/- Groupe des Proteus :

Des souches de Proteus appartenant aux quatre espèces rentrent aussi dans le cadre de notre étude ; elles ont des caractères communs : absence de fermentation du lactose, uréase rapidement positive en milieu synthétique et tryptophane-désaminase positive ; des tests permettent de les séparer :

	Uréase	Indole	Mannitol	SH_2
Pr. vulgaris ..		+	-	+
Pr. mirabilis .		-	-	+
Pr. morganii ..		+	-	-
Pr. rettgeri ..		+	+	-

L'utilisation du citrate en milieu synthétique du type Koser ou Simmons est variable pour les différentes espèces de ce genre et, dans une certaine mesure, variable dans une espèce d'une souche à l'autre ; c'est pourquoi, bien que l'action sur le citrate ait peu d'intérêt pour le diagnostic des Proteus, il nous a semblé utile d'en étudier quelques souches.

Nous n'avons pas inclu, dans cette série, de souches de Providencia qui sont très voisines des Proteus et sont citrate-positives.

TABLEAU I

Espèces	Nombre de souches	Milieu de Simmons	Milieu de Christensen	Milieu synthétique + glucose	Milieu synthétique + glucose + citrate
E. coli	20	-	18	18	18
A.D. 01	23	-	20	20	20
A.D. 02	5	-	4	4	4
A.D. 03	26	-	18	17	17
A.D. 04	4	-	3	3	3
A.D. 05	7	-	5	5	5
Paracoli	20	-	14	11	11
S. Para A	1	-	1	-	-
P. vulgaris	6	4	6	4	4
P. mirabilis	11	10	10	10	10
P. morganii	9	-	-	-	-
P. rettgeri	6	6	6	6	6
Shigella	30	-	-	-	-
Klebsiella	4	4	4	4	4

Milieu de Simmons ou Milieu synthétique glucosé : - = pas de culture ; le chiffre est celui de souches qui se développent.

Milieu de Christensen ou Milieu synthétique glucosé et citraté : - = pas de virage vers l'alcalinité ; le chiffre est celui des souches qui alcalinisent le milieu.

Résultats

Nous avons rassemblé dans un tableau (I) les résultats obtenus avec 172 souches sur le milieu de Simmons, celui de Christensen et deux milieux synthétiques, l'un seulement glucosé, l'autre contenant glucose et citrate.

On voit, par ce tableau, que Klebsiella et toutes les souches de Proteus rettgeri poussent sans difficulté sur milieu au citrate de Simmons, comme il est classique pour ces deux espèces, qu'ils se développent aussi quand la source de carbone est du glucose et, naturellement, quand le milieu est plus complexe.

En opposition, Proteus morganii et les différentes Shigella ont donné des résultats uniformément négatifs ; l'absence de culture sur milieu synthétique, avec le glucose comme seule source de carbone, nous explique l'absence de l'utilisation du citrate en milieu synthétique ; il faut à ces germes, pour se développer, un facteur de croissance, quelque chose qui n'est pas fourni dans ce milieu et dont ils sont incapables de faire la synthèse. Ces souches ont donné une culture normale sur le milieu de Christensen, mais sans alcaliniser le milieu ; donc, même en leur fournissant tous les facteurs de croissance contenus dans l'extrait de levure, on ne modifie pas le comportement de ces germes vis-à-vis de l'acide citrique qu'ils sont, dans ces conditions du moins, définitivement incapables d'utiliser.

Dans les différents groupes qui sont inscrits dans le tableau, les résultats sont variables:

Pour l'espèce Proteus vulgaris, on sait que certaines souches sont incapables de se développer sans acide nicotinique fourni dans le milieu. On voit, dans le tableau, que ces souches, qui ne poussent pas en milieu synthétique, se multiplient sur un milieu au citrate de Christensen ; la culture y est d'ailleurs lente et faible et le virage au rouge très léger ; les quantités d'acide nicotinique sont peut-être peu importantes dans l'extrait de levure que nous avons utilisé.

Le cas de la seule Salmonella "paratyphique A" que nous ayons étudiée semble analogue ; il faut, pour ces synthèses, un des composés conte-

nus dans l'extrait de levure.

On voit, sur ce même tableau, que Proteus mirabilis est citrate-positif ; une souche, cependant, sur les onze examinées, reste citrate-négative, mais il semble que son cas soit différent, puisque, même sur le milieu de Christensen, il donne une réaction négative.

Proteus morganii et toutes les souches de Shigella testées sont citrate-négatifs, quel que soit le milieu sur lequel elles sont cultivées. Un certain nombre de ces souches sont cependant capables de cultiver sans facteurs de croissance, ainsi que le montre la présence d'une culture acide sur le milieu contenant seulement du glucose comme source de carbone. L'utilisation du citrate dans ce milieu n'est donc pas liée, tout au moins pour un certain nombre de souches, à la présence de facteurs de croissance.

Dans la plupart des cas, Escherichia coli, les "Paracoli" et les Alkalescens-Dispar dans leur grande majorité se développent bien sur le milieu synthétique contenant glucose et citrate associés ; c'est cependant dans ce groupe qu'il y a la plus grande variété dans le comportement individuel des germes :

- les uns utilisent le glucose et le citrate en milieu synthétique ;
- d'autres se développent sur ce milieu, mais sans être pour autant capables d'utiliser l'acide citrique ;
- d'autres enfin ne poussent que sur le milieu de Christensen, en utilisant ou non l'acide citrique.

Mais la règle générale, pour ces germes, est qu'ils se comportent sur milieu synthétique avec glucose et citrate comme sur le milieu de Christensen.

Conclusions

De ces expériences, on peut tirer les conclusions suivantes : Un milieu synthétique simple, associant au citrate le glucose comme source d'énergie, permet, dans la grande majorité des cas, d'apprécier l'aptitude des germes du groupe des Escherichia (en particulier de la variété Alkalescens-Dispar) à utiliser l'acide citrique et fournit, par là, un élément au diag-

nostic différentiel entre Shigella, d'une part, et Alkalescens-Dispar, d'autre part ; il s'agit là, en effet, de problèmes qui se posent souvent et qui sont habituellement difficiles à résoudre rapidement.

o o

2)- ETUDE QUALITATIVE EN MILIEU SYNTHETIQUE LIQUIDE.

Pour compléter les notions obtenues par cette étude de la culture en présence de citrate et de glucose sur milieu minéral solide, nous avons préparé le même milieu liquide, la seule modification étant donc l'absence de gélose.

Ce milieu était réparti en tubes d'Yvan Hall, tubes assez étroits, comportant un étranglement situé à cinq centimètres environ du fond du tube ; une zone d'anaérobiose est ainsi établie dans la partie profonde.

Comme dans les expériences précédentes, nous avons utilisé en même temps trois séries de milieux : glucosé, citraté ou contenant une association des deux sources de carbone.

Notre expérience a été faite avec un petit nombre de souches : 27 seulement, avec des résultats très exactement semblables à ceux obtenus en milieu solide, mais cependant plus rapides.

Dans les tubes contenant l'association citrate-glucose, on constate que l'acidification rapide du tube, en quelques heures, se fait dans tous les cas et sur toute la hauteur du milieu ; si le germe, dans les conditions de nos expériences, utilise le citrate, l'alcalinisation du milieu se fait d'abord sous forme d'un anneau rouge (indicateur : rouge de phénol) à la partie tout à fait supérieure du tube, et c'est seulement dans les jours suivants qu'elle envahit la profondeur du milieu de haut en bas.

Ces résultats pourraient suggérer que, dans ces conditions, l'utilisation du citrate ne se fait pas par la voie du cycle de Krebs.

o o

3)- MESURE QUANTITATIVE DE L'UTILISATION DU CITRATE.

Un autre moyen de montrer cette utilisation de l'acide citrique par les germes du groupe Escherichia coli est la mesure de la croissance de ces germes en présence de cette source de carbone. Si ces germes se servent du citrate, il en résulte un accroissement de la culture par rapport au témoin dépourvu de citrate.

Nous avons fait l'étude quantitative du phénomène en utilisant :

1/- la souche de Klebsiella A 240, qui reste notre témoin, capable d'utiliser le citrate comme source unique de carbone ;

2/- différentes souches d'Escherichia coli, capables, elles, de transformer l'acide citrique, à condition d'avoir une autre source d'énergie, c'est-à-dire du glucose dans le cas de ce travail.

Technique

Nous nous sommes servie d'un milieu de base enrichi de l'association citrate et glucose avec, comme témoins, le glucose seul et le citrate seul.

1/- Milieu.

Nous avons préparé le même milieu (formule de Simmons) qui était utilisé dans nos expériences sur le phénomène qualitatif, mais sans qu'il soit gélosé ou additionné d'indicateur et surtout sans aucune source de carbone :

Sulfate de magnésie	0,2 g.
Phosphate mono-ammoniacal	1,0 g.
Phosphate bipotassique	1,0 g.
Chlorure de sodium	5,0 g.
Eau distillée	1000 ml.

Cette base est répartie en trois portions et on ajoute :

a)- dans la première :

Citrate de soude 2 g./1000

b)- dans la deuxième :

Glucose 0,2 g./1000

c)- dans la troisième :

Citrate de soude 2 g./1000

Glucose 0,2 g./1000

Le milieu est réparti en fioles Fourneau de 250 ml. de contenance à raison de 50 ml. de milieu par fiole. On bouche au coton. On stérilise à l'autoclave 15 minutes à 115°.

Le petit volume du milieu (50 ml.), réparti dans un récipient de volume cinq fois supérieur et à large ouverture, assurera une bonne aération de la culture, aération qui est presque indispensable pour obtenir un développement rapide du germe.

On répartit aussi du milieu de base dans des tubes de 17 mm. de diamètre, tubes qui serviront à la préparation de l'inoculum destiné à ensemencer les fioles Fourneau.

2/- Préparation de l'inoculum.

Nous avons préparé l'inoculum de la façon suivante : à partir d'une culture sur gélose inclinée, on ensemence un tube de 17 mm. contenant le milieu de base additionné de glucose et de citrate ; au bout de 24 heures si la culture est abondante, après 48 heures si elle se développe plus lentement, on repique cette première culture en milieu synthétique dans un deuxième tube qui, lui, servira le lendemain à ensemencer la fiole Fourneau, dans laquelle on fera les prises d'essai nécessaires à l'étude de la densité optique.

3/- Culture en fiole Fourneau.

Dans des expériences préliminaires, nous avons vérifié que la culture était stationnaire dans les tubes d'inoculum, la densité optique restant stable.

Nous avons essayé des inoculums d'importance croissante ; finalement, nous nous sommes arrêtée à un inoculum d'un volume de 4 ml. environ ; avec les inoculums plus faibles, la culture était trop lente et la courbe de croissance évoluait pendant trop longtemps.

Après avoir ensemencé les fioles Fourneau avec l'inoculum convenable, on les place dans un bain-marie à 30°, comportant un système permettant l'agitation de la fiole ; cette technique permet d'obtenir une culture bien homogène et en même temps aérée.

Au bout de quelques instants, on fait une prise d'essai pour mesurer au photomètre la densité de la culture au départ. On renouvelle cette prise d'essai toutes les demi-heures ou toutes les heures, pour connaître, par l'intermédiaire de l'accroissement de la densité optique, le rythme et l'importance de la culture bactérienne.

Dans ces conditions d'expérience, où toutes les données sont identiques : inoculum, température, temps, aération, la seule variable est la source ou les sources de carbone utilisées ; donc, toutes les différences dans les densités optiques seront liées à ce facteur ; l'utilisation d'une source de carbone se traduira par une augmentation rapide de la densité optique dans la fiole Fourneau où elle est présente.

Résultats

Après une phase de latence variable, en fonction de l'importance de l'inoculum, de l'état de la culture dans le tube, de la présence ou de l'absence de sources de carbone résiduelles dans cet inoculum, variable encore avec les sources de carbone dans le milieu neuf, la culture se met à augmenter rapidement et d'une façon régulière en phase exponentielle ; puis, elle atteint son maximum, la phase stationnaire, qui se situe à une opacité, c'est-à-dire à une abondance de culture variable selon la quantité de carbone que les germes ont pu utiliser.

Ces résultats se traduisent sur une courbe, que l'on peut construire en fonction du temps (porté en abscisse) et des densités optiques portées en ordonnées. Cette courbe, si l'inoculum est faible et la culture inoculée en phase stationnaire, reste d'abord presque parallèle à l'abscisse pendant le temps de latence; puis, ensuite, la courbe s'infléchit vers la ligne de l'ordonnée et devient sensiblement une droite, pendant la phase de culture exponentielle ; cette phase achevée, elle s'infléchit de nouveau

vers l'abscisse pendant la phase stationnaire.

L'aspect de la courbe est variable selon la source de carbone utilisée et selon la souche.

Nous avons choisi, pour les représenter ici, deux courbes qui nous ont semblé résumer d'une façon satisfaisante nos résultats : l'une faite avec Aerobacter, qui utilise l'acide citrique comme seule source de carbone ; l'autre, avec Escherichia coli, qui est incapable de se développer avec cette unique source de carbone.

Pour des raisons d'ordre pratique, nous avons choisi de représenter des courbes d'emblée en phase exponentielle, avec un inoculum important :

1/- Avec Aerobacter A 240, sur la Figure I, bien que, sur milieu de Simmons, cette souche donne une culture très abondante en 24 heures et un virage du bleu de bromothymol extrêmement rapide, on voit que l'utilisation du citrate provoque une culture assez peu abondante comparée à celle obtenue avec le glucose et plus encore avec l'association citrate glucose ; ceci bien que la concentration de glucose soit dix fois inférieure à celle du citrate.

2/- Avec la souche d'Escherichia coli Ankara, la courbe obtenue avec l'acide citrique comme seule source de carbone reste très basse, mais la croissance n'est cependant pas nulle ; en contraste, la courbe obtenue avec le glucose seul croît très rapidement et atteint des taux importants; avec l'association citrate glucose, la croissance est plus rapide et le taux atteint plus élevé. L'importance relative de la courbe obtenue avec le citrate seul nous a semblé disproportionnée avec les résultats obtenus en milieu solide, et nous nous sommes demandé si l'inoculum important et le départ de la culture d'emblée en phase exponentielle n'étaient pas accompagnés, dans nos expériences, d'une présence résiduelle de glucose assez importante pour justifier, du moins en partie, cette culture (Fig.II).

3/- Pour préciser l'importance de l'apport de source de carbone avec l'inoculum, nous avons procédé de façon différente :

A partir d'une culture sur gélose, lavée avec le milieu de base et centrifugée, nous avons préparé une suspension ne contenant, du fait de

la technique utilisée, aucune source de carbone ; les fioles Fourneau, devant servir à la mesure des densités optiques, étaient ensemencées avec cette suspension. Les courbes représentées sur la Figure III donnent les résultats de cette expérience.

On voit que, dans ces conditions, après une phase de latence de deux heures environ, deux courbes, celle du glucose et celle de l'association glucose citrate, partent en phase exponentielle, traduisant une importante augmentation de la densité optique, donc de l'importance de la culture ; en deux heures, la phase stationnaire est atteinte. Au contraire, la courbe obtenue avec le citrate seul reste pendant quatre heures à un niveau qui s'élève à peine, et, en six heures, elle atteint son taux maximum de densité optique, aux environs de 28 unités photométriques, ce qui reste un taux négligeable.

Dans ces conditions, l'utilisation du citrate par Escherichia coli est donc pratiquement négligeable.

En conclusion,

La mesure des densités optiques, pour contrôler l'abondance des cultures, confirme les résultats obtenus, en montrant que :

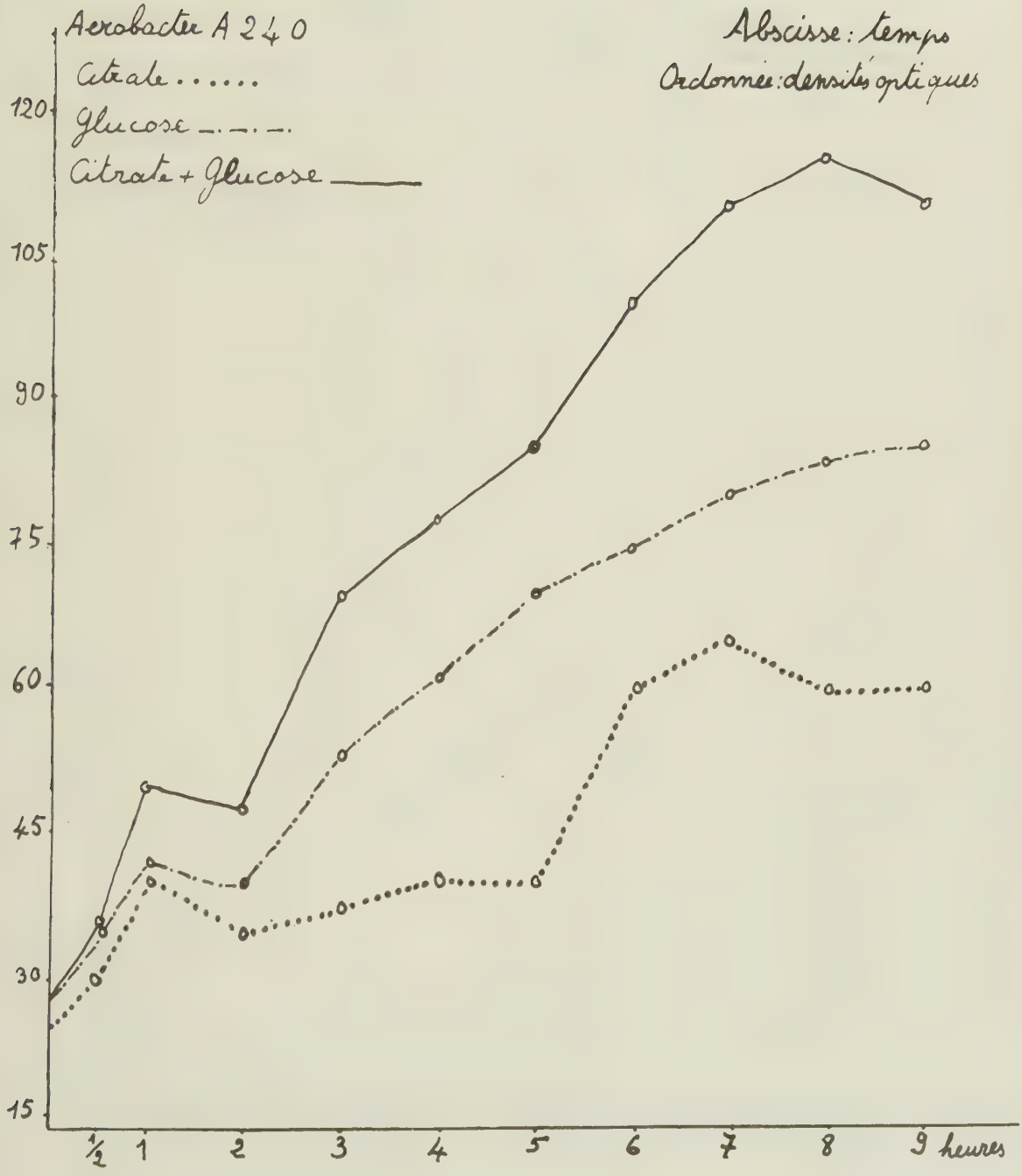
1)- l'apport d'une source d'énergie est nécessaire pour qu'Escherichia coli pousse en présence d'acide citrique ;

2)- dans ces conditions, l'utilisation du citrate, déjà mise en évidence sur milieu solide par la modification de couleur de l'indicateur, se traduit par une courbe des densités optiques plus élevée que celle obtenue avec le glucose seul.

o

o o

Fig. I


Aerobacter A 240
Citrate .....
Glucose -.-.-.
Citrate + Glucose ———
Abscisse : temps
Ordonnée : densités optiques
120
105
90
75
60
45
30
15
½
1
2
3
4
5
6
7
8
9 heures

- D -

ÉTUDE DES SOUCHES CITRATE-NÉGATIVES

On a vu que les germes des groupes Coli-Alkalescens utilisent l'acide citrique, à la seule condition qu'on leur fournisse une source de carbone associée ; il s'agit du glucose dans le cadre de cette étude.

Il existe, dans chaque groupe de bactéries, des exceptions à cette donnée expérimentale, - exceptions qui, pour être rares, n'en méritent pas moins de retenir l'attention. Sans avoir voulu entreprendre une étude complète de ces cas, qui nous demandera certainement un travail très important, nous avons fait quelques expériences, qui nous ont montré qu'il y avait là un problème complexe.

Le problème, pour ces souches, se résout de façon variable selon les cas. On se souvient que le protocole de nos expériences comporte :

1)- un milieu synthétique minéral avec du glucose,
2)- un milieu synthétique avec du citrate (milieu de Simmons),
3)- un milieu minéral avec citrate et glucose associés,
4)- un milieu de Christensen modifié.

Tantôt les germes restent citrate-négatifs sur les quatre milieux, comme c'est le cas pour toutes les souches étudiées du groupe des Shigella.

Tantôt ils alcalinisent le milieu de Christensen et ne modifient pas les autres milieux.

Dans l'un ou l'autre cas, ou bien les bactéries ne se développent pas sur le milieu synthétique, ou bien elles poussent normalement sur les milieux contenant du glucose, mais n'alcalinisent pas les milieux contenant de l'acide citrique, et, par conséquent, sont incapables d'utiliser cette source de carbone.

Les quelques expériences que nous avons faites, pour clarifier nos idées sur ces points particuliers, ont un caractère fragmentaire ; aussi, nous semble-t-il préférable d'exposer les observations que nous avons pu faire dans différents groupes de bactéries, plutôt que d'essayer d'exposer

des idées générales.

Voici les données que nous avons recueillies au sujet de divers germes.

1)- Cas des bacilles dysentériques.

On sait que ces germes sont incapables d'utiliser l'acide citrique non seulement sur milieu synthétique simple, avec le citrate comme seule source de carbone, mais aussi en milieu complexe comme le milieu de Christensen.

Dans la pratique quotidienne du laboratoire, cette observation est d'un extrême intérêt, puisque ce critère biochimique permet de séparer les Shigella, d'une part des Alkalescens-Dispar,et de certaines Escherichia coli immobiles et agazogènes d'autre part.

SZYMONA SZTURM-RUBINSTEN et coll. ont, du reste, montré que l'addition d'asparagine seule à un milieu de Simmons rendait certaines souches capables d'utiliser l'acide citrique.

De ces faits, il ressort de toute évidence que les souches de Shigella, comme beaucoup d'autres, sont capables d'utiliser le citrate, à condition qu'on leur fournisse un autre facteur d'énergie ; dans le cas des Shigella, ce facteur ne saurait être le glucose ; il peut, pour un certain nombre d'entre elles, être l'asparagine seule.

Avec six souches de bacilles dysentériques, ne cultivant pas sur le milieu de Simmons et n'utilisant pas le citrate dans le milieu de Christensen, mais citrate-positives avec l'association citrate-asparagine, nous avons fait une comparaison avec les résultats obtenus sur citrate et glucose. Voici, résumée en Tableau II, cette expérience en milieu synthétique :

1/- avec citrate et asparagine (C + A),

2/- avec citrate et glucose (C + G),

3/- avec asparagine seule (A) comme témoin.

T A B L E A U II

	C+A	C+G	A	
S. sonnei N.C.8	+ 1	-	Culture neutre	
S. sonnei N.C.11	+ 3	-	"	"
S. flexneri 1 b B.1294	+ 3	Culture acide	"	"
S. flexneri 4 b PP.293	+ 3	Culture acide	"	"
S. flexneri 5 Br1 181	+ 1	Culture acide	"	"
S. dysenteriae 7 Ba g12	+ 1	-	"	"

+ = Culture alcaline. - = Pas de culture.

Ces six souches sont capables d'utiliser le citrate, à condition qu'on leur fournisse aussi de l'asparagine ; trois d'entre elles sont incapables de se développer avec le glucose comme seule source de carbone ; c'est là une raison suffisante pour qu'elles n'utilisent pas l'association citrate glucose. Les trois autres, des bacilles de Flexner, poussent avec le glucose comme seule source de carbone ; cependant, elles ne peuvent, dans ces conditions, faire la synthèse des enzymes nécessaires à la transformation du citrate.

2)- Nous avons étudié aussi le cas de trois souches de Proteus :

une souche de P. vulgaris, une de P. mirabilis et une de P. morganii.

a)- La souche A 244 de P. vulgaris (collection de l'Institut Pasteur) se développe et utilise le citrate en six jours, c'est-à-dire très lentement, sur le milieu de Christensen ; le résultat est le même avec notre milieu synthétique additionné de glucose, de citrate et d'acide nicotinique, tandis qu'il ne se développe pas sur le même milieu en l'absence de cette vitamine, qui constitue pour lui un facteur de croissance. Cette souche ne pousse pas non plus sans glucose. L'association des deux facteurs, glucose et acide nicotinique, lui est donc indispensable pour faire la transformation de l'acide citrique.

b)- P. mirabilis O X K (de la même collection) se développe sur milieu de Christensen et sur milieu de Simmons additionné d'acide nicotinique en alcalinisant le milieu. Il se multiplie bien aussi sur milieu synthétique avec l'association citrate, glucose et acide nicotinique, mais donne alors une culture acide. On peut envisager l'hypothèse que l'utilisation du citrate est trop faible pour qu'en présence de glucose, qui acidifie fortement le milieu, une alcalinisation secondaire puisse se produire.

c)- La souche de P. morganii A 236 n'a jamais utilisé l'acide citrique, bien que nous ayons essayé des combinaisons variées d'acide nicotinique, tryptophane et asparagine, avec ou sans glucose, bien qu'elle alcalinise très légèrement le milieu de Christensen.

Le cas des souches de ce type nécessiterait une étude faite de façon systématique avec des mélanges de vitamines, d'acides aminés et de bases puriques et pyrimidiques, ce que nous pensons pouvoir faire un jour, tandis que les deux premières souches de Proteus ne se développaient pas sur milieu synthétique, en raison de leur exigence en vitamine.

3)- Etude de quelques souches d'Escherichia coli et Alkalescens-Dispar.

Dans ce groupe, certaines souches se comportent comme les Shigella, et S. SZTURM-RUBINSTEN a étudié, avec 46 souches, E. coli, coliforme et Alkalescens-Dispar ; parmi elles, 4 seulement, citrate-positives sur le milieu de Christensen, ne se développaient pas sur un milieu citrate-asparagine.

Ces souches citrate-négatives en présence d'asparagine ont des exigences variées :

- les unes ont besoin de glucose,
- les autres exigent un facteur de croissance.

Pour les souches citrate-négatives sur le milieu de Christensen, on peut penser que ces souches ne trouvent pas, dans l'extrait de levure, les éléments nécessaires à la synthèse de leur enzyme, ou qu'un cofacteur de la réaction manque.

Nous avons rassemblé quelques résultats obtenus avec des Paracoli et des Alkalescens-Dispar.

	Chr.	C+G	C+N	G+N+C	C+T	C+T+G
1081 A.D:03	-	ac.	-	ac.	-	-
B.1299 P.C.A.	-	ac.	-	ac.	-	ac.
S.55709 P.C.A.	-	ac.	-	ac.	-	-
Le Bre.A.D:03	+8	a18	-	+ 2	-	+

Note : Chr = Christensen ; C+G = citrate et glucose ; C + N = citrate et acide nicotinique ; C+N+G = citrate et acide nicotinique plus glucose ; C+T = citrate et tryptophane ; C+T+G = citrate et tryptophane plus glucose ; A.D:03 = Alkalescens-Dispar du groupe O 3 ; P.C.A. = Paracoli agazogène et immobile ; ac = acidifié ; al = alcalinisé ; les chiffres indiquent le jour du virage après l'ensemencement

o
o o

Conclusions

Pour résumer les résultats que nous ont fournis les expériences que nous avons résumées dans les pages précédentes, expériences faites sur les souches incapables d'utiliser l'acide citrique pour leurs synthèses en milieu synthétique simple avec du glucose comme source complémentaire d'énergie, nous envisageons les résultats obtenus de la façon suivante :

1/- Certaines souches sont incapables de se développer sur un milieu synthétique simple, que la source de carbone soit le citrate, le glucose ou l'association des deux facteurs.

2/- D'autres, sans action sur le citrate seul, se multiplient en présence de glucose et de l'association glucose-citrate, mais la culture reste acide, montrant que le citrate n'est pas utilisé ; et la présence d'acide citrique en milieu liquide ne modifie pas l'abondance des germes. Dans ce cas, nous pensons avoir montré que, dans un certain nombre de nos expérien-

ces, l'adjonction d'un facteur de croissance : tryptophane, asparagine ou acide nicotinique, était nécessaire pour cette synthèse.

3/- Pour un dernier groupe de germes, très peu nombreux dans le groupe E. coli-Alkalescens-Dispar, nous n'avons pu mettre en évidence un facteur ou une association de facteurs leur permettant de transformer l'acide citrique pour leurs synthèses. Il en est de même pour certains germes du groupe des Shigella et pour ceux des germes de l'espèce P. morganii que nous avons eu l'occasion d'examiner. Nous pensons qu'une étude plus complète montrerait que, dans le groupe des Entérobactéries du moins, l'utilisation de l'acide citrique est habituelle, mais qu'elle ne se fait, comme celle du glucose par exemple, que dans la mesure ou certains facteurs indispensables pour une bactérie donnée sont présents dans le milieu.

= IV =

C O N C L U S I O N S

Dans le groupe des Entérobactéries, une distinction déjà ancienne sépare les germes capables d'utiliser l'acide citrique en milieu synthétique, comme seule source de carbone. Cette distinction a permis, par exemple, de scinder l'ancien groupe des bacilles du colon en Escherichia coli (citrate -) et Aerobacter (citrate +).

Dans des travaux plus récents, CHRISTENSEN, d'une part, et HAJNA, d'autre part, ont montré que les germes "citrate-négatifs" pouvaient, par culture sur un milieu complexe ou semi-synthétique, être séparés en "citrate +" et "citrate -".

Le travail que nous venons d'exposer a permis de montrer que :

1°)- En préparant un milieu synthétique qui associe à l'acide citrique une source de carbone supplémentaire, le glucose, dans le cadre de nos expériences, on obtenait les mêmes résultats qu'avec le milieu de Christensen ; en général, le virage à l'alcalinité est même plus rapide en milieu synthétique solide.

De ces expériences, il ressort que les germes qui n'utilisent pas le citrate en milieu de Simmons ont seulement besoin d'un facteur énergétique, soit pour faire la synthèse de l'enzyme, soit pour franchir la paroi cellulaire.

Nous avons montré que le phénomène se produisait aussi en milieu

liquide et essentiellement dans la zone d'aérobiose.

Nous avons mesuré les résultats obtenus, c'est-à-dire l'importance de la croissance de la culture en fonction des différentes sources d'énergie qui étaient proposées aux germes ; pour ceci, nous avons mesuré les densités optiques au cours des différentes phases de la culture. Nous avons signalé l'importance de l'inoculum et de son état physiologique.

2°)- Parmi les souches assez rares qui restent citrate-négatives sur milieu synthétique avec une source supplémentaire de carbone, un bon nombre sont encore capables d'utiliser l'acide citrique :

= Les unes sont, en effet, incapables de se développer en présence de glucose seul et il leur faut un facteur de croissance qui, en permettant leur culture, les rende aussi aptes à utiliser le citrate.

= Les autres ont besoin d'un facteur essentiel : acide aminé ou vitamine, pour transformer le citrate, bien qu'ils soient capables de se développer sur un milieu synthétique avec le glucose comme seule source de carbone. Pour ceux-ci, la présence de glucose n'est pas forcément requise pour que l'acide citrique soit utilisé ; c'est le cas, par exemple, d'un bon nombre de Shigella, qui n'ont besoin que d'asparagine pour se développer et utiliser le citrate.

= D'autres enfin restent "citrate-négatives" dans les expériences que nous avons rapportées dans ce travail. Nous pensons qu'il s'agit là d'une apparence et qu'un travail plus complet nous montrerait quels sont les facteurs indispensables à cette utilisation ; il est, en effet, difficilement concevable que des bactéries fermentatives soient incapables d'utiliser le citrate ; le problème est plus probablement celui de la pénétration de cet acide dans la cellule. Il est bien évident, du reste, que les conditions expérimentales que nous avons réalisées avec un milieu synthétique nous apportent des informations valables, mais qu'elles sont très loin des conditions naturelles ; on ne peut donc en tirer aucune conclusion sur ce qui se passe dans la nature.

Toutefois, il nous semble que des recherches plus systématiques, por-

tant sur les conditions de culture et sur les facteurs essentiels, nous permettront d'approcher de plus près ces problèmes.

VU & PERMIS D'IMPRIMER :

Le Recteur
de l'Académie de Paris,

J. ROCHE

Le Doyen
de la Faculté de Médecine,

L. BINET

Le Président de la Thèse,

P. MOLLARET

B I B L I O G R A P H I E

1 - AYERS (S.H.) and RUPP (P.) - Simultaneous acid and alkalin bacterial fermentations from dextrose and salts of organic acids respectively.- J. Inf. Dis., 1918, 23, 188-216.

2 - AYERS (S.H.), RUPP (P.) and JOHNSON (W.T.) - A study of the alkali forming bacteria found in milk.- 1919, Bull. 782, U.S. Dept. Agr.-

3 - BARRET (E.F.), LARSON (A.D.) and KELLIS (R.E.) - The nature of the adaptative lag of Pseudomonas fluorescens toward citrate.- J. Bact., 1953, 65, 187-192.

4 - BROWN (H.C.) - Observations on the use of citrated media.- Lancet, 1921, 5079, 22-23.

5 - CAPALDI und PROSKAUER - Beitrage zur Kenntniss der Saürebildung bei Typhus bacillus und Bacterium coli.- Zeitsch. für Hyg., 1896, 23, 452-474.

6 - CHRISTENSEN (W.B.) - Hydrogen sulfide production and citrate utilisation in the differentiation of the enteric pathogens and the coliform bacteria.- Research Bull., 1949, N° 1.

7 - COHEN (G.) and MONOD (J.) - Bacterial permeases.- Bact. Rews, 1957, 21, 169-194.

8 - DUGLEY (S.) and DAWES (E.A.) - Dessimilation of citric acid by bacterial extracts.- Nature, 1953, 172, 345-346.

9 - FILDES (P.) - The growth of Proteus on amonium lactate plus nicotinic acid.- Brit. J. Exp. Path., 1938, 19, 239-244.

10 - FOULKES (F.C.) - Citrate metabolism and cell permeability.- J. of Bact., 1954, 68, 505.

11 - GALL (E.F.) - The passage of certain amino-acids across the cell-wall and their concentration in the internal environement of Streptococcus foecalis.- J. Gen. Microbiology, 1947, 1, 53-76.

12 - HAJNA (A.A.) - Utilisation of Citrate by Gram-negative Organisms of the intestinal Group together with the formula of a new citrate Agar.- Pub. Health Laboratory, 1955, 13, N° 1.

13 - KOSER (S.A.) - Utilisation of the salts of organic Acids by the Colon-Aerogenes Group.- J. Bact. 1923, 8, 493-520.

14 - LARA (F.J.S.) and STOKES (J.L.) - Oxydation of Citrate by Escherichia coli.- J. Bact., 1952, 63, 41, 5-420.

15 - LE MINOR (L.) et BEN HAMIDA (F.) - Avantages de la recherche de la galactosidase sur celle de la fermentation du lactose en milieu complexe dans le diagnostic bactériologique, en particulier des Enterobacteriaceae.- Annales de l'Institut Pasteur, 1962, 102, 267-277.

16 - LWOFF (A.) et QUERIDO (A.) - La spécificité de l'acide nicotinique, facteur de croissance pour B. proteus.- C.R. Soc. Biol. 1939, 130, 1, 569.

17 - LOMINSKI (I.), CONWAY (N.S.), HARPER (E.M.) and REUNIE (J.B.) - Utili-

sation of citric acid by some socalled citrate non utilising bacteria.- Nature, 1947, 160, 573-574.

18 - MAASSEN (A.) - Beiträge zur Ernährungsphysiologie der Spaltpilze. Die organischen Saüren also Nähstoffe und ihre Zersetzbarkeit durch die Bakterien.- Arb. a. d. Kaiserlichen gesundheit, 1895, 12, 340-344.

19 - MAC DONALD (R.E.) and GERHARDT (P.) - Bacterial permeability : the uptake and oxydation of citrate by Escherichia coli.- Can. J. Bact., 1958, 4, 109-124.

20 - PARR (L.W.) - Sanitary significance of the succession of coli-aerogenes organisms in fresh and stored feces.- Am. J. Pub. Health 1936, 26, 39-45.

21 - PARR (L.W.) and SIMPSON (W.F.) - Coliform "Mutants" with respect to the utilisation of citrate.- J. Bact., 1940, 40, 467.

22 - PESCH (K.) - Die Verwertbarkeit verschiedener Stickstoff und Kohlenstoffquelen durch die Bakteria der Typhus-coli-gruppe. Eine neuer das Wachstum von Bacterium coli hemmender Nährboden für Paratyphus B.- Cent. f. Bakt., 1 Abst. Orig., 1921, 86, 97-101.

23 - REESE (H.), VAUGHN (J.T.), OSBARNI (T.), WEDDING (G.T.), BEISEL (C.G.) and BRAXTON (T.) - The utilisation of citrate by E. coli.- J. Bact., 1950, 60, 19-27.

24 - RUCKHOFT (C.C.), KALLAS (J.G.), CHINN (B.) and COULTER (E.W.) - Coli-Aerogenes differenciation in water analysis. II- The biochimical differential tests and their interpretation.- J. Bact., 1931, 22, 125-181.

25 - SZTURM-RUBINSTEN (S.) et PIECHAUD (D.) - Sur l'utilisation du citrate

dans la tribu des Escherichieae.- Ann. Inst. Pasteur, 1959, 97, 360-369.

26 - SZULMASTER (J.), GRUNBERG-MANAGO (M.) - Utilisation du citrate par Escherichia coli.- Experientia, 1952, 8, 26-28.

27 - SIMMONS (J.S.) - A culture medium for differentiating organisms of typhoïd-colon-aerogenes group and for isolation of certain fungi.- J. Inf. Dis. 1926, 39, 209-214.

28 - VAN ERMENGEN et VAN LAER - Contribution à l'étude des propriétés biochimiques du bacille d'Eberth et de Bact. coli.- Trav. du Laboratoire d'Hygiène et de Bactér. de l'Univers. de Gand, 1892, 1, fasc. 2.

29 - WHEAT (R.W.), WONG (D.T.O.) and AGL (S.J.) - Enzymatic breakdown of citrate in the absence of coenzyme A.- J. Bact., 1954, 68, 19-23.

30 - WHEAT (R.W.) and AGL (S.J.) - Citritase, the citrate-splitting enzyme for Escherichia coli.- J. Biol. Chem., 1955, 217, 109.